

Aus dem Institut für Radiologie, AG Experimentelle Radiologie,  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung einer bimodalen Sonde  
für die MRT- und Fluoreszenzbildgebung  
auf Basis Europium-dotierter Eisenoxid-Nanopartikel

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yuske Kobayashi

aus Hamburg

Datum der Promotion: 06.09.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>3</b>
Abstract.....	3
Einführung .....	6
Methodik.....	8
Ergebnisse.....	14
Diskussion .....	16
Literaturverzeichnis .....	20
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>23</b>
<b>Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....</b>	<b>24</b>
<b>Der Promotion zugrunde liegende Publikationen .....</b>	<b>27</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>65</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>68</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>70</b>

# Zusammenfassung

## Abstract

**Motivation:** Die Verbesserung des histologischen und analytischen Nachweises von Magnetresonanz (MR)-aktiven superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIOs) und deren eindeutige Differenzierung vom physiologischen Eisenhintergrund für die biomedizinische Forschung.

**Zielsetzung:** Es wurde die Einsetzbarkeit von mit Europium- ( $\text{Eu}^{3+}$ -) Ionen dotierten SPIOs als bimodale Sonde für die MR-Bildgebung, für die histologische Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie für die quantitative Analytik mittels Spektrophotometrie untersucht. Hierfür wurde eine spezielle Variante von SPIOs, sehr kleine superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (VSOPs), verwendet.

**Methodik:** VSOPs, elektrostatisch stabilisiert über eine Citratbeschichtung, wurden synthetisiert, einerseits mit und andererseits ohne  $\text{Eu}^{3+}$ -Dotierung (Eu-VSOPs bzw. VSOPs). Eu-VSOPs und VSOPs wurden charakterisiert und ihre physikochemischen Eigenschaften miteinander verglichen. Eine sowohl für die Analytik als auch für die Histologie anwendbare Antennenlösung wurde entwickelt, welche die Fluoreszenz der  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen in den Eu-VSOPs verstärkt. Eu-VSOPs wurden am Zellmodell RAW264.7 histologisch mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie auch analytisch mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie untersucht. Die Ergebnisse aus diesen beiden Nachweismethoden wurden mit denen aus den jeweiligen klassischen Methoden für Eisennachweise verglichen: Die histologische Berliner-Blau-Färbung bzw. die analytische Bestimmung des Eisengehalts mit der Phenanthrolin-Methode über Photometrie.

**Ergebnisse:** Eu-VSOPs unterscheiden sich von VSOPs nicht in ihren Eigenschaften hinsichtlich ihrer hydrodynamischen Größe, ihrer Kerndurchmesser sowie ihren Signalverstärkungseffekten in der MR-Bildgebung. Es wurde eine Antennenlösung entwickelt, welche bei einem pH-Wert von 6,6 und damit nahe des physiologischen Bereichs puffert und dabei sowohl eine große Pufferkapazität als auch eine große Stabilität gegenüber Eisenionen aufweist. Mittels dieser Antennenlösung wurde der genaue Anteil der  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen in den Eu-VSOPs spektrophotometrisch bestimmt. Als Anwendung am Zellmodell konnte nachgewiesen werden,

dass die Fluoreszenzmikroskopie Eu-VSOPs mit einer höheren Empfindlichkeit nachweisen kann als die Lichtmikroskopie in Kombination mit der Berliner Blau-Färbung. Sowohl in der Mikroskopie als auch in der analytischen Quantifizierung der Eu-VSOPs mittels Fluoreszenzdetektion wird der Partikelnachweis nicht durch einen eventuell vorhandenen Eisenhintergrund verfälscht.

**Schlussfolgerungen:** Die Dotierung von VSOPs mit  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen bietet in Kombination mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Antennenlösung die Möglichkeit, sowohl qualitative wie quantitative, eindeutige Aussagen hinsichtlich Pharmakokinetik und Biodistribution der Eisenoxid-Nanopartikel auf zellulärer Ebene treffen zu können.

## Abstract

**Background:** There is a need to improve the histological and analytical detection limits for magnetic resonance (MR) active superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs), and to develop a method to unambiguously differentiate them from the background physiological iron, for biomedical research.

**Objective:** The applicability of SPIOs with europium ( $\text{Eu}^{3+}$ ) dotation as a bimodal tool for MR imaging, and histological detection via fluorescence microscopy, as well as for quantitative analytics using spectrophotometry was investigated. For this, very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles (VSOPs), a variant of SPIOs, were used.

**Methods:** VSOPs were electrostatically stabilized by means of a citrate coating. In addition to standard VSOPs, particles were also synthesized with  $\text{Eu}^{3+}$  dotation (Eu-VSOPs), and the physicochemical properties of both particles were compared. An antenna solution was developed to enhance the fluorescence of the  $\text{Eu}^{3+}$  ions in the Eu-VSOPs. The applicability of the antenna solution for analytics and for histology was determined. Eu-VSOPs were investigated in RAW264.7 cells histologically via fluorescence microscopy and analytically by means of fluorescence spectrophotometry. The results of these two fluorescent detection methods were compared with detection by standard methods for iron detection: the histological Prussian Blue staining and the analytical determination of the concentration of iron-phenanthroline complexes via photometry.

**Results:** No difference between Eu-VSOPs and VSOPs was detected in terms of hydrodynamic size, core diameter and signal enhancing effects in MR imaging. An antenna solution buffering with a great capacity near the physiological pH (6.6) was developed. The fluorescence enhancing effect of the antenna solution was highly stable in the presence of iron ions. By means of the antenna solution, the exact proportion of  $\text{Eu}^{3+}$  ions in the Eu-VSOPs was determined spectrophotometrically. In the cell model, the detection of Eu-VSOPs with the antenna solution was more sensitive than with light microscopy and Prussian Blue staining. For microscopy as well as for analytical quantification of Eu-VSOPs, the detection of the particles via fluorescence methods allows to differentiate the particles from eventually existing background iron.

**Conclusions:**  $\text{Eu}^{3+}$  doped VSOPs in combination with the antenna solution developed here provide an effective tool for unambiguous qualitative and quantitative investigation of the pharmacokinetics and biodistribution of iron oxide nanoparticles at the cellular level.

## Einführung

Seit über 30 Jahren werden verschiedene Varianten von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIOs für engl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles) entwickelt und erforscht. Das Interesse galt hierbei besonders der Anwendung der Partikel als Magnetresonanz- (MR-) Kontrastmittel und deren Anwendung als spezifische Marker für pathologische Veränderungen (1; 2), aber auch für Zellmarkierungen und Zell Tracking (3; 4). In den letzten Jahren werden SPIOs mit speziellen magnetischen Eigenschaften als Tracer für das Magnetic Particle Imaging (MPI) optimiert und in der experimentellen Forschung eingesetzt (5).

Eine spezielle Variante von SPIOs sind VSOPs. Diese sind elektrostatisch stabilisierte, citratbeschichtete sehr kleine Eisenoxid-Nanopartikel (VSOPs für engl. very small iron oxide nanoparticles). Sie besitzen einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 10 nm und zeichnen sich aufgrund ihrer Beschichtung durch eine geringe Zytotoxizität aus (6). Eine erste Version dieser VSOPs wurde als Blood Pool Kontrastmittel für die MR-Angiographie bis zur klinischen Phase II entwickelt (7-9). Nachfolgende Versionen wurden für speziellere Anwendungen weiterentwickelt, etwa für die zelluläre Bildgebung (9-12), für die Detektion von Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke (13) oder für die Charakterisierung von atherosklerotischen Plaques (14; 15).

Für diese experimentellen und präklinischen Anwendungen der VSOPs bzw. der SPIOs allgemein, spielen die pharmakokinetischen Eigenschaften der Partikel eine entscheidende Rolle. Dazu gehören etwa die Halbwertszeiten im Blut oder die Organverteilung der Partikel einschließlich ihrer absoluten Akkumulation im Gewebe. Bei Untersuchungen hinsichtlich dieser pharmakokinetischen Eigenschaften stellt der physiologische Eisenhintergrund in Geweben einen limitierenden Faktor für mikroskopische wie auch analytische Methoden zum Nachweis des SPIO-Eisens dar (16; 17). In der Histologie hat sich die Berliner-Blau Färbung zur Standardprozedur entwickelt (18), jedoch kann das endogene Eisen in den Proben zu falsch positiven Detektionen von SPIOs führen (16; 17). Dem analogen Problem sieht man sich gegenüber, wenn zur Quantifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel die Eisenanalytik herangezogen wird. Aus diesem Problem entstand die Idee, die Eisenoxid-Nanopartikel an der Oberfläche mit Fluoreszenzfarbstoffen zu koppeln, was tatsächlich auch für Untersuchungen zur biologischen Verteilung angewandt wird (19). Diese Modifikation der Beschichtung der Eisenoxid-Nanopartikel birgt jedoch das Risiko, Veränderungen der pharmakokinetischen

Eigenschaften und ggf. auch spezifischer Bindungseigenschaften nach sich zu ziehen. Dieser Effekt ist besonders für kleine SPIOs ausgeprägt (8; 9; 15).

Ein Lösungsansatz für diese genannten Probleme besteht darin, Lanthanid-Ionen direkt in den Partikelkern einzudotieren. Die Arbeitsgruppe um Groman demonstrierte die Realisierbarkeit dieser Idee, indem in Dextran-stabilisierte Partikel Europium- ( $\text{Eu}^{3+}$ -) Ionen dotiert wurden (20). Die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen können während des Syntheseprozesses der Eisenoxid-Nanopartikel leicht als Dotiermaterial in die Partikelkerne eingebracht werden (21). Zwar sind die intrinsischen luminophoren Eigenschaften des Europiums sehr schlecht, was insbesondere auf den elektronischen Übergang  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  zutrifft, da dieser elektrische Dipolübergang formal verboten ist (Laporte-Verbot). Diese Auswahlregel lässt sich jedoch aufweichen, indem man sich eines sogenannten Antennenmoleküls bedient, auch Enhancermolekül genannt, welches mit dem Europium als Zentralion einen Komplex bildet. Dieses Antennenmolekül absorbiert die Energie aus dem Anregungslicht, transferiert die Energie weiter an das Zentralion Europium und hebt damit letzteres in einen angeregten Zustand. Beim Übergang zurück in den Grundzustand emittiert das Europium Licht der Wellenlänge 610-620 nm (22). Die Anwendung der Antennenmoleküle hat folgende Vorteile: Zum einen ist die Emissionsbande des genannten Übergangs  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  mit einer Halbwertsbreite von etwa 10 nm sehr schmal. Dies ist darauf zurückzuführen, dass dieser Übergang ein Innerschalen-Übergang zwischen 4f-Orbitalen darstellt, wodurch die Fluoreszenz kaum äußeren Einflüssen unterliegt. Zum anderen ist die große Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge, genannt Stokes shift, zu nennen. Dieser hat den Vorteil, dass besonders in der Fluoreszenzmikroskopie durch den Einsatz geeigneter Filtersysteme eine selektive Detektion nur der Europiumfluoreszenz möglich ist. Schließlich zeichnet sich der angeregte Zustand des Europiums durch eine lange Lebensdauer im Millisekundenbereich aus, da der Übergang zurück in den Grundzustand Laporte-verboten ist. Dieser Umstand kann ebenfalls bei der selektiven Europiumdetektion genutzt werden, etwa in Form von Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) oder Time Resolved Fluorescence (TRF) (23).

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Frage, ob sich diese Vorteile der optischen, hochspezifischen Detektion mit denen der oben beschriebenen VSOPs kombinieren lassen, wenn letztere mit  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen dotiert werden (im Folgenden mit Eu-VSOPs abgekürzt). Die Arbeit selbst umfasste drei Hauptaufgaben:

1. die physikochemische Charakterisierung der Eu-VSOPs und der VSOPs ohne Europiumdotierung hinsichtlich Europiumgehalte, Größen, magnetische sowie MR-Bildgebungseigenschaften (publiziert in (24-26)).
2. die Entwicklung einer Antennenlösung, welche sowohl die Europiumfluoreszenz aus den Eu-VSOPs zu verstärken vermag als auch den speziellen Anforderungen dieser Arbeit hinsichtlich Histologie und Analytik entspricht (publiziert in (25; 26)).
3. die qualitative (= fluoreszenzmikroskopische) wie quantitative (= spektrophotometrische) Detektion der Eu-VSOPs am Zellmodell sowie der Vergleich zu den jeweils entsprechenden klassischen Nachweismethoden. Als Zellmodell diente die Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 (publiziert in (25)).

Die beiden letztgenannten Punkte stellen an die Eu-VSOPs die Anforderung, nicht nur im aufgelösten Zustand detektierbar zu sein, wie es bei der Arbeitsgruppe um Groman der Fall war (20), sondern dass sie auch im unaufgelösten, intakten Zustand detektierbar sein müssen.

Das Kernziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob Eu-VSOPs nicht nur als Kontrastmittel für die MR-Bildgebung, sondern auch zusätzlich für histologische und analytische Untersuchungen bei Fragestellungen hinsichtlich Biodistribution und Pharmakokinetik, wie sie etwa häufig in der präklinischen Forschung auftreten, verwendet werden können, wobei die Nutzung der  $\text{Eu}^{3+}$ -Fluoreszenz als sensitiver Surrogatmarker den Nachweis von Partikelkonzentrationen auch unabhängig vom physiologischen Eisenhintergrund ermöglicht.

## Methodik

### Synthese und Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel

Es wurden elektrostatisch stabilisierte, citratbeschichtete, sehr kleine Eisenoxid-Nanopartikel (VSOPs) synthetisiert, basierend auf der Methode von Goodarzi et al., mittels Ko-Präzipitation von Eisen(II)-chlorid und Eisen(III)-chlorid bei einem molaren Verhältnis von 1:2 (27).

Neben den VSOPs wurden VSOPs mit Europium- ( $\text{Eu}^{3+}$ -) Dotierung synthetisiert, was durch Ersetzen von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen durch  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen beim ersten Arbeitsschritt der Synthese erfolgte. Es wurden insgesamt acht Sorten dieser Eu-VSOPs hergestellt, wobei die Massenverhältnisse  $m(\text{Eu}^{3+})/m(\text{Fe}^{3+})$  bei der Synthese 1,0 %, 2,1 %, 3,1 %, 3,8 %, 5,0 %, 5,1 %, 7,7 % und 10,2 % betrugen. Die Nanopartikelsorte mit dem Massenverhältnis 5,0 % erhielt in der Publikation (24)



die Bezeichnung Eu-VSOP, soll jedoch in dieser Zusammenfassung der Verständlichkeit halber Eu-VSOP-5\* genannt werden. Die restlichen Eu-VSOPs wurden entsprechend den aufsteigenden Europiumanteilen mit Eu-VSOP-1 (1,0 %), -2 (2,1 %), -3 (3,1 %), -4 (3,8 %), -5 (5,1 %), -6 (7,7 %) und -7 (26) bzw. -10 (25) (jeweils 10,2 %) bezeichnet. Die Nanopartikelsorte ohne Europiumdotierung erhielt die Bezeichnung VSOP.

Die Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser der Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte in 10 mM HEPES bei pH 7,4 und bei einer Eisenkonzentration von 1 mM mittels dynamischer Lichtstreuung. Die mittleren Durchmesser der Partikelsorten VSOP, Eu-VSOP-4, -5\* und -7 wurden durch Auswertung von Transmissionselektronenmikroskopie-(TEM-) Bildern ermittelt. Die Relaxivitäten R1 (T1-Relaxivität) als auch R2 (T2-Relaxivität) der Partikel wurden an einem Time-domain Kernspinresonanz- (TD-NMR-) Analysator bei einer Magnetfeldstärke von 0,94 T bestimmt. Die Bestimmung des Eisengehalts in den Nanopartikeln erfolgte einerseits klassisch über die Phenanthrolin-Methode. Andererseits wurde der Eisengehalt der Nanopartikel indirekt auf optischem Wege bestimmt, was später näher erläutert wird.

Im Folgenden werden Nanopartikelkonzentrationen in Lösungen immer bezogen auf Eisen angegeben.

### **Nanopartikelphantom für die MRT**

Es wurden Magnetresonanztomographie- (MRT-) Aufnahmen eines Eisenoxid-Nanopartikelphantoms durchgeführt. Das Phantom stellte eine Konzentrationsreihe von Eu-VSOP-5 und VSOP dar, wobei die Partikel jeweils in 8 % Mannitollösung verdünnt waren. Die Konzentrationen der Eisenoxid-Nanopartikel betrugen 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 4,0 mM und 8,0 mM. Die Proben dieser Konzentrationsreihe befanden sich in PCR-Tubes, welche ihrerseits in einem Block aus 3 % Low Melting Agarose immobilisiert waren.

Die MRT-Bilder wurden an einem Ganzkörper MR-Scanner mit einer Magnetfeldstärke von 1,5 T aufgenommen, in Kombination mit einer 4-Kanal-Handgelenkspule. Dabei wurde eine T1-gewichtete fast low-angle shot (FLASH) 3D Sequenz und eine T2\*-gewichtete FLASH 2D Sequenz verwendet.

Aus den MR-Aufnahmen wurden die relativen Signalintensitäten der Probelösungen bestimmt, indem bei der Auswertung entsprechende Regions of interests (ROIs) sowohl in den einzelnen PCR-Tubes als auch in der Agarosematrix gesetzt wurden.

## **Nachweis der Eu-VSOPs durch Fluoreszenzdetektion**

Es wurden qualitative und quantitative Fluoreszenzuntersuchungen an Eu-VSOPs durchgeführt. Die qualitativen Nachweise fanden in Form von histologischen Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop statt, wobei ein Filterset verwendet wurde, bestehend aus einem Anregungsfilter, einem Strahlteiler und einem Emissionsfilter. Sämtliche Fluoreszenzaufnahmen wurden mit 400-facher Vergrößerung bei einer Belichtungszeit von 10 s realisiert.

Die quantitativen Nachweise von Probelösungen erfolgten am Spektrophotometer bei einer Anregungswellenlänge von 338 nm, einer Emissionswellenlänge von 616 nm, einer Spaltbreite von 10 nm und einer Spannung der Photomultiplier tubes (PMT) von 400 V.

## **Antennenlösung für die Europiumfluoreszenz**

Die optischen Nachweise von Eu-VSOPs wurden durchgeführt, indem einerseits die durch Auflösung der Partikel freigewordenen  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen, andererseits die an intakten Partikeln befindlichen  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen zur Fluoreszenz angeregt wurden. Um diese Europiumfluoreszenzen mit dem Emissionsmaximum bei 616 nm in einer detektierbaren Intensität zu erhalten, bedurfte es einer Antennenlösung, auch Enhancerlösung genannt, welche die Fluoreszenz des reinen Europiums verstärkt.

In dieser Arbeit wurden drei Antennenlösungen verwendet, von denen zwei kommerziell erworben wurden (DELFLIA Inducer, DELFLIA Enhancement Solution; Perkin Elmer, USA); während eine selbst hergestellt wurde. Im Folgenden wird der DELFLIA Inducer mit DI, die DELFLIA Enhancement Solution mit DES und die hausintern hergestellte Antennenlösung mit MES (für engl. Modified Enhancement Solution) abgekürzt. Die MES zeichnet sich im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Antennenlösungen dadurch aus, dass ein Dihydrogenphosphat-Hydrogenphosphat-Puffer verwendet wird, dessen Pufferbereich mit einem pH-Wert von 6,6 nah am physiologischen Bereich liegt.

## **Vergleich der Antennenlösungen**

Zunächst wurde überprüft, ob die MES die Fluoreszenz des Europiums in vergleichbarem Maße verstärkt wie die DES. Dazu wurden die Intensitäten der Europiumfluoreszenzen, die mit dem MES erhalten wurden, verglichen mit denen, die mit DES gewonnen wurden. Hierbei betrugen die Europiumkonzentrationen der Probelösungen zwischen 1 und 100 nM, realisiert mit einem Europiumstandard. Dieser Vergleich beider Antennenlösungen resultierte in zwei Eichgeraden,

die eine Verknüpfung zwischen der Fluoreszenzintensität des Europiums und der entsprechenden Europiumkonzentration in einer Probelösung herstellt.

Als nächstes wurde untersucht, wie stark das Vorhandensein von Salzsäure und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen die Fluoreszenzverstärkung der beiden Enhancerlösungen beeinflusst. Bei diesem Vergleich wurde eine Konzentrationsreihe jeweils hinsichtlich Salzsäure sowie  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen in den Probelösungen erstellt. Bei ersterer Untersuchung betrugen die Europiumkonzentrationen 1 mM mit Salzsäurekonzentrationen zwischen 0 und 0,9 M; bei zweiterer lagen die Europiumkonzentrationen bei 0,5 mM mit Konzentrationen an  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zwischen 0 und 1000  $\mu\text{M}$ .

Schließlich wurde untersucht, inwieweit sich die Fluoreszenzverstärkung beider Enhancerlösungen an Eu-VSOPs mit der Zeit verändert. Hierfür wurden die Fluoreszenzintensitäten von Eu-VSOP-7 jeweils mit beiden Antennenlösungen über eine Zeit von 6 Stunden alle 2 Minuten spektrophotometrisch bestimmt, wobei die Nanopartikelkonzentration der Proben 60 nM betrug. Die Eisenoxid-Nanopartikel wurden für diese Untersuchung nicht aufgelöst, sondern im intakten Zustand belassen.

### **Quantifizierung des eingebauten Europiums in den Eu-VSOPs**

Um zu überprüfen, ob die bei der Nanopartikelsynthese jeweils verwendete Menge an Europium vollständig in die VSOPs eingebaut wurde, erfolgte eine Bestimmung der molaren Verhältnisse zwischen Europium und Eisen in den synthetisierten Eu-VSOPs. Dies geschah, indem separat einerseits die Europium-, andererseits die Eisenkonzentrationen in den Partikelsuspensionen bestimmt wurden.

Zur Ermittlung der Europium- bzw. Eisenkonzentrationen wurden die Partikelsuspensionen zunächst jeweils in 6 M Salzsäure aufgelöst und dann mit Wasser verdünnt. Für die Bestimmung der Europiumkonzentrationen wurden die Intensitäten der Europiumfluoreszenzen unter Verwendung einer Antennenlösung (DI bzw. MES) spektrophotometrisch gemessen. Anhand von Eichgeraden konnten diesen gemessenen Fluoreszenzintensitäten entsprechende Europiumkonzentrationen zugeordnet werden. Die Bestimmung der Eisenkonzentration erfolgte über die Phenanthrolin-Methode.

Das molare Verhältnis ergibt sich als Quotient aus der Europium- und der Eisenkonzentration  $c(\text{Eu}^{3+})/c(\text{Fe}^{3+})$ . Abschließend wurde aus dem so ermittelten molaren Verhältnis das

Massenverhältnis ermittelt und mit dem Massenverhältnis verglichen, welches bei der Synthese verwendet wurde.

### **Anwendung am Zellmodell RAW264.7**

Die Methode, Eu-VSOPs über die Europiumfluoreszenz nachzuweisen, wurde am Zellmodell etabliert, wobei sowohl qualitative als auch quantitative Untersuchungen durchgeführt wurden. Als Zellmodell dienten Makrophagen der Linie RAW264.7, die mit den entsprechenden Eu-VSOPs bzw. VSOPs inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte dabei in Zellkulturmedien, in welchen die Eisenoxid-Nanopartikel in verschiedenen definierten Konzentrationen enthalten waren.

### **Histologie**

Es wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Eu-VSOPs beladenen RAW264.7-Zellen durchgeführt. Dabei wurde untersucht, inwieweit unterschiedliche Faktoren Einfluss auf die Fluoreszenzintensitäten der Eu-VSOPs in den Zellen haben.

Diese Einflussfaktoren waren:

1. Unterschiedliche Nanopartikelkonzentrationen in den Inkubationslösungen.
2. Unterschiedliche Europiumgehalte der von den Zellen aufgenommenen Eu-VSOPs.

Für die erste Untersuchung wurden die RAW264.7-Zellen für eine Stunde mit Eu-VSOP-7 inkubiert. Die Inkubationslösungen hatten jeweils eine Nanopartikelkonzentration von 0,4 mM, 0,6 mM und 0,8 mM. Für die zweite Untersuchung wurden die Zellen für eine Stunde mit den Nanopartikelsorten Eu-VSOP-1, -3, -7 sowie, als Kontrolle, mit VSOP inkubiert. Die Inkubationslösungen besaßen jeweils eine Nanopartikelkonzentration von 0,5 mM. Die Inkubation selbst fand auf Objektträgern mit aufgesetzten Kammern statt. Nach der Inkubation mit den Eisenoxid-Nanopartikeln wurden die Zellen gewaschen, fixiert, mit MES inkubiert und mit Eideck-Medium und Deckglas abgedeckt. Anschließend erfolgten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Im zweiten Untersuchungsschritt erfolgten an den histologischen Zellproben Berliner Blau-Färbungen, von denen anschließend mikroskopische Durchlichtaufnahmen gemacht wurden. Die Färbung erfolgte nach den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, also nach Entfernung des Deckglases und dem Herauswaschen der Enhancerlösung. Die Aufnahmen beider Nachweismethoden wurden miteinander verglichen.

## **Analytik**

Die Aufnahme von Eu-VSOPs durch RAW264.7-Zellen wurde quantitativ bestimmt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der von den Zellen aufgenommenen Eu-VSOPs spektrophotometrisch bestimmt. Über die bereits zuvor erwähnte Eichgerade konnte von der gemessenen Fluoreszenzintensität auf den Europiumgehalt und, zusammen mit dem jeweils bekannten molaren Verhältnis zwischen Eisen und Europium, auf die Menge an Eisenoxid-Nanopartikeln geschlossen werden, die von den Zellen aufgenommen wurden.

Diesbezüglich wurden drei Untersuchungen durchgeführt:

1. Es wurde überprüft, ob diese Methode der Nanopartikelquantifizierung das gleiche Ergebnis liefert wie die bereits für die Analytik etablierte Phenanthrolin-Methode.
2. Der mögliche Einfluss unterschiedlicher Europiumgehalte in den Eu-VSOPs auf das Aufnahmeverhalten der RAW264.7-Zellen wurde überprüft.
3. Die Auswirkung unterschiedlicher Nanopartikelkonzentrationen in den Inkubationslösungen auf das Aufnahmeverhalten der Zellen wurde untersucht.

Bei der ersten Untersuchung wurden die Zellen für 24 Stunden mit Eu-VSOP-1 bei einer Nanopartikelkonzentration von 0,5 mM inkubiert. Für die zweite Untersuchung wurden die RAW264.7-Zellen einerseits für den Fluoreszenznachweis für eine Stunde jeweils mit Eu-VSOP-1, -3 und -7 inkubiert. Andererseits wurden die Zellen für den Phenanthrolinnachweis für zwei Stunden jeweils mit Eu-VSOP-7 und VSOP inkubiert. Die Nanopartikelkonzentration der Inkubationslösungen betrug stets 0,5 mM. Bei der letzten Untersuchung wurden die Zellen für eine Stunde mit Eu-VSOP-7 bei Nanopartikelkonzentrationen von 0,4 mM, 0,6 mM sowie 0,8 mM inkubiert.

Bei allen Untersuchungen wurden die Zellen nach der Inkubation gewaschen, gezählt, in Säure aufgelöst und anschließend mit Lauge neutralisiert. Durch den Einsatz der Säure wurden nicht nur die Zellen, sondern auch die Eisenoxid-Nanopartikel aufgelöst. Entsprechend konnte aus der so erhaltenen Lösung mithilfe des MES und des Spektrophotometers über die Fluoreszenz des Europiums auf den Nanopartikelgehalt geschlossen werden, die sich in den Zellen befunden hatten. Die quantitative Eisenbestimmung mittels der Phenanthrolin-Methode kam neben der ersten Untersuchung auch für die zweite zum Einsatz: Da bei der VSOP eine Europiumdotierung fehlte, konnte die Nachweismethode über die Fluoreszenz nicht angewendet werden.

# Ergebnisse

## Physikochemische Eigenschaften der Eisenoxid-Nanopartikel

Die Synthese der Eu-VSOPs fand mit Massenverhältnissen  $m(\text{Eu}^{3+}):m(\text{Fe}^{3+})$  von 1,0 %, 2,1 %, 3,1 %, 3,8 %, 5,0 %, 5,1 %, 7,7 % sowie 10,2 % statt. Die Untersuchung der synthetisierten Nanopartikel mittels der Fluoreszenz- und der Phenanthrolin-Methode ergab jedoch als resultierende Massenverhältnisse 0,7 %, 1,3 %, 1,6 %, 1,9 %, 1,8 %, 2,1 %, 2,2 % und 2,7 % . Die absolute Menge an eingebautem Europium nimmt also mit steigendem Massenverhältnis in der Einwaage zu, während aber der relative Anteil der eingebauten Europiumionen im Vergleich zur Einwaage abnimmt.

Der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser der Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikel betrug  $10,6 \pm 2,9$  nm, der der Partikel ohne Europiumdotierung  $10,8 \pm 2,8$  nm. Der Polydispersitätsindex lag hierbei zwischen 0,09 und 0,11. Der mittlere Kerndurchmesser der Partikel VSOP, Eu-VSOP-4, -5\* und -7 wurde zu etwa 8 nm bestimmt. Die magnetischen Eigenschaften der Eisenoxid-Nanopartikel betreffend nimmt sowohl die T1- als auch die T2-Relaxivität mit zunehmender Menge an eingebautem Europium tendenziell ab: Für die T1-Relaxivität von  $32 \text{ (mMs)}^{-1}$  zu  $19 \text{ (mMs)}^{-1}$  und für die T2-Relaxivität von  $85 \text{ (mMs)}^{-1}$  bis  $53 \text{ (mMs)}^{-1}$ . Die Abnahme der Partikelrelaxivität ist zwar signifikant, wirkt sich jedoch nur minimal auf die bildgebenden Eigenschaften aus. Dies bestätigen auch die MR-Aufnahmen von Eu-VSOP-5 und VSOP im Nanopartikelphantom, wo sich hinsichtlich des Vorhandenseins der Europiumdotierung keine Unterschiede in den Signalintensitäten sowohl in der T1- wie auch in der T2-Gewichtung zeigen. Die Differenzen in den relativen Signalintensitäten zwischen den beiden Partikelsorten befinden sich innerhalb der Standardabweichungen.

## Die Antennenlösungen

Die kommerziell erwerbbar (DES) wie auch die hausintern hergestellte Enhancerlösung (MES) zeigten ähnliche Verstärkungsvermögen der Europiumfluoreszenzen, was sich an der vergleichbaren Steigung beider Eichgeraden darstellte. Hinsichtlich Empfindlichkeiten der Verstärkungsvermögen beider Antennensysteme bei Vorhandensein an Salzsäure sowie  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen in den Probelösungen zeigte sich, dass die MES gegenüber diesen Einflüssen sehr viel stabiler war. So bricht die Fluoreszenzverstärkung für die DES bereits bei einer Salzsäurekonzentration von etwa 0,05 mM deutlich ein, während dies für die MES erst bei etwa der 10-fachen Konzentration der Fall ist. Ebenso büßt die DES ihr Vermögen zur Fluoreszenzverstärkung bei Eisenkonzentrationen von über 1  $\mu\text{M}$  deutlich ein; dies passiert im

Falle der MES erst bei etwa der 100-fachen Konzentration.

Beim Vergleich der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenzverstärkung beider Antennenlösungen an Eu-VSOP-7 konnte festgestellt werden, dass die DES nach etwa 2 Stunden moderat und nach 3 Stunden drastisch ihr Verstärkungsvermögen verliert, während dies für die MES selbst nach 6 Stunden nicht der Fall ist. Bei letztgenannter Antennenlösung nimmt das Verstärkungsvermögen sogar während dieser Zeit stetig leicht zu.

### **Anwendung am Zellmodell – Histologie und Analytik**

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Einflusses steigender Konzentration von Eu-VSOP-7 in den Inkubationslösungen von 0,4 mM über 0,6 mM zu 0,8 mM zeigte sich ein Anstieg der entsprechenden  $\text{Eu}^{3+}$ -Fluoreszenzintensitäten in den RAW264.7-Zellen. Auch konnte fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden, dass unterschiedliche Europiumgehalte in den Eisenoxid-Nanopartikeln, aufsteigend von Eu-VSOP-1 über -3 zu -7, mit einer stärkeren Fluoreszenz in den entsprechenden Zellen einhergeht. Bei der Kontrolle mit VSOP konnte wie erwartet keine Fluoreszenz beobachtet werden. Es zeigte sich zudem in dieser Untersuchung, dass diese Methode der optischen Detektion über die Fluoreszenz der  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen eine niedrigere Nachweisgrenze besitzt als die Berliner Blau-Färbung.

Im ersten, analytischen Untersuchungsschritt wurde mit der Fluoreszenz- und der Phenanthrolin-Methode die durch die Zellen aufgenommene Menge an Eu-VSOP-1 zu  $2,2 \text{ pg} \pm 0,1 \text{ pg}$  pro Zelle bestimmt. Beide Methoden liefern demnach übereinstimmende Ergebnisse.

Die im Rahmen des zweiten Untersuchungsschritts mittels der Fluoreszenzanalyse ermittelte aufgenommene Menge an Eisenoxid-Nanopartikeln pro Zelle betrug für Eu-VSOP-1  $0,18 \text{ pg} \pm 0,02 \text{ pg}$ , für Eu-VSOP-3  $0,19 \text{ pg} \pm 0,03 \text{ pg}$  und für Eu-VSOP-7  $0,17 \text{ pg} \pm 0,02 \text{ pg}$ . Demnach sind die Mengen der von den Zellen aufgenommenen Eu-VSOPs innerhalb der Standardabweichungen vergleichbar. Die über die Phenanthrolin-Methode bestimmte Menge an aufgenommenen Partikeln der Sorten VSOP und Eu-VSOP-7 lagen bei  $0,75 \text{ pg} \pm 0,07 \text{ pg}$  bzw. bei  $0,67 \text{ pg} \pm 0,08 \text{ pg}$ . Die Nanopartikelsorte mit der höchsten Europiumdotierung wird also innerhalb der Standardabweichungen vergleichbar von den Zellen aufgenommen wie die Partikel ohne Europiumdotierung.

Das Resultat des letzten Abschnitts dieser Untersuchung ergab, dass die Zellen bei Partikelkonzentrationen von 0,4 mM, 0,6 mM und 0,8 mM Eu-VSOP-7 jeweils  $0,15 \text{ pg} \pm 0,01 \text{ pg}$ ,  $0,21 \text{ pg} \pm 0,01 \text{ pg}$  sowie  $0,30 \text{ pg} \pm 0,02 \text{ pg}$  pro Zelle aufgenommen haben. Mit

zunehmender Nanopartikelkonzentration geht also ein linearer Anstieg der aufgenommenen Partikelmenge einher.

## Diskussion

### Eigenschaften der Eu-VSOPs

Der Einbau von Europium in den Eisenkern der VSOPs zeigt unterschiedliche Auswirkungen. Es zeigte sich zum einen, dass die Europiumdotierung keinen Einfluss auf die hydrodynamische Größe der Eisenoxid-Nanopartikel hat (24-26). Dies ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von de Silva et al. (28). Hingegen hat sich gezeigt, dass die Dotierung die magnetischen Eigenschaften der Partikel mindert (25; 26). Auch aus anderen Untersuchungen zu Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikeln ist bekannt, dass Dotierungen mit hohem Europiumanteil verminderte T1- bzw. T2-Relaxivitäten zur Folge haben (20; 21). Allerdings belegen Auswertungen der MR-Bilder, dass keine relevanten Unterschiede zwischen Eisenoxid-Nanopartikeln mit und ohne Europiumdotierung hinsichtlich der Signalbeeinflussung in der MR-Bildgebung zu erkennen sind (25). So zeigte auch die Nanopartikelsorte mit der höchsten Europiumdotierung, Eu-VSOP-7, in *in vivo* Experimenten MR-Signale, welche stark genug waren, um einzelne Zellen mittels MRT zu detektieren (29). Zudem konnten VSOPs mit vergleichbaren MR-Eigenschaften in atherosklerotischen Plaques im MRT nachgewiesen werden (15).

Die Beobachtung, dass die absolute Menge an eingebautem Europium von Eu-VSOP-1 zu -7 zunimmt, während der relative Anteil der eingebauten Europiumionen im Verhältnis zur Einwaage bei der Synthese abnimmt, ist nicht ganz geklärt. Da  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen eine andere elektrochemische Eigenschaft besitzen als  $\text{Fe}^{3+}$ - oder  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, wird davon ausgegangen, dass  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen während des Kristallisationsprozesses nicht exakt gleichartig wie die Eisenionen in das Gitter eingebaut werden (21). Auch wird sicherlich der sehr viel größere Ionenradius der  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen im Gegensatz zu den  $\text{Fe}^{3+}$ - oder  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen eine Rolle spielen.



## Die Antennenlösung MES

Da  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen für sich alleine sehr schlechte optische Eigenschaften haben, bedurfte es einer Antennenlösung, auch Enhancerlösung genannt, welche die Fluoreszenz der Europiumionen verstärkt. Für diese Arbeit wurden sowohl kommerziell erwerbbare Antennenlösungen verwendet (DI bzw. DES) als auch eine, welche hausintern hergestellt wurde (MES). Diese Enhancerlösungen basieren alle auf Hemmilä et al. (30; 31) und bestehen aus vier Komponenten: Einem  $\beta$ -Diketon, Trioctylphosphinoxid (TOPO), Triton X-100 und einer Pufferlösung. Es wird davon ausgegangen, dass die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen von drei  $\beta$ -Diketon- sowie zwei TOPO-Molekülen koordiniert werden, während das Triton X-100 eine Micellenstruktur um den gesamten Komplex bildet. Letzteres sorgt dafür, dass die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen vor Wasser, welches einen quenchenden Effekt auf die Fluoreszenz hat (30; 31), geschützt sind. Die Fluoreszenzverstärkung erfolgt dadurch, dass Energie in Form von Licht bei einer Wellenlänge um 338 nm von den  $\beta$ -Diketon-Molekülen aufgenommen und auf das Europiumion übertragen wird. Die über diese Fluoreszenzverstärkung erzeugte Europiumfluoreszenz hat insbesondere den Vorteil, eine sehr scharfe Emissionslinie bei 616 nm zu haben, begründet in dem Übergang  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ , einem Innerschalenübergang, welcher von externen Einflüssen überwiegend geschützt ist (32).

Die hausinterne Antennenlösung MES wurde entwickelt, da die kommerziell erhältlichen Enhancerlösungen einige für Anwendungen in dieser Arbeit nachteilige Eigenschaften haben. Zum einen haben die beiden Antennenlösungen DI als auch DES einen Pufferbereich bei tiefen pH-Werten. So liegt der Pufferbereich von DES bei pH-Werten zwischen 2,2 und 4,0 (25). Für diese Arbeit und auch für künftige *ex vivo* Untersuchungen wird jedoch eine Antennenlösung benötigt, welche möglichst im physiologischen pH-Bereich puffert. Zudem sollte der Pufferbereich möglichst breit sein. Die hausinterne Antennenlösung MES liegt bei einem pH-Wert von 6,6 und puffert im pH-Bereich zwischen 5,8 und 8,0 (25; 26). Außerdem weist die MES eine große Pufferkapazität auf, was insbesondere für Untersuchungen an organischen Materialien wichtig ist, da letztere hierbei häufig in stark sauren Lösungen aufgelöst werden. Eine weitere Anforderung an die Antennenlösung seitens dieser Arbeit bestand in der Stabilität der Fluoreszenzverstärkung gegenüber  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, da diese in biologischen Proben in großen Mengen auftreten. Auch hier ist die MES der DES überlegen, wie die Ergebnisse gezeigt haben (26). Als Grund für die Abnahme der Fluoreszenzverstärkung durch die Zunahme von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen wird eine konkurrierende Komplexbildung zwischen  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen bzw.  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen mit den Antennenmolekülen angesehen (26).

Aus dem Resultat der Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenzverstärkung an Eu-VSOP-7 können zwei Erkenntnisse gewonnen werden. Die erste, allgemeine, ist, dass es möglich ist, anhand beider Enhancerlösungen (MES und DES) die Fluoreszenz nicht nur von freien  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen, sondern auch von  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen in den Eisenoxid-Nanopartikeln zu verstärken. Es wird davon ausgegangen, dass dies durch die kleine Größe der Eu-VSOPs ermöglicht wird, so dass die Antennenmoleküle der Enhancerlösungen die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen an der Oberfläche der Partikel komplexieren können während sich die Micellenstrukturen aus Triton X-100 jeweils um ein gesamtes Partikel zusammen mit den Antennenmolekülen ausbilden können (26).

Die zweite Erkenntnis aus der Untersuchung ist, dass die MES im Vergleich zur DES ein sehr viel länger stabiles Fluoreszenzsignal liefert. Die Ursache hierfür ist noch nicht geklärt; es wird jedoch davon ausgegangen, dass der niedrige pH-Wert sowie die freie Essigsäure der DES zu einem Freisetzen von Eisen aus den Nanopartikelkernen führt, was wiederum die Abnahme der Fluoreszenz zur Folge hat (26).

Trotz der Modifikationen zeigt die MES ein vergleichbares Verstärkungsvermögen der Europiumfluoreszenz wie die kommerziell erhältliche DES (25; 26). Sie bietet somit angesichts der Optimierungen ein Mittel zur verbesserten analytischen Quantifizierung des Europiums.

### **Anwendung am Zellmodell**

Es wurden sowohl histologische als auch analytische Fluoreszenzuntersuchungen an Eu-VSOPs in Zellen durchgeführt, wobei als Zellmodell die Makrophagenlinie RAW264.7 diente.

Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte entnommen werden, dass eine steigende Konzentration von Eu-VSOP-7 in den Inkubationslösungen von 0,4 mM über 0,6 mM zu 0,8 mM ein Anstieg der  $\text{Eu}^{3+}$ -Fluoreszenz in den RAW264.7-Zellen zur Folge hat. Die entsprechende analytische Untersuchung bestätigt dies; es liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Inkubationskonzentration und der Fluoreszenzintensität vor, in Übereinstimmung mit (33).

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Europiumgehalte in den Eu-VSOPs auf die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten in den Zellen konnte beobachtet werden, dass mit jeweils höheren Europiumanteilen stärkere Fluoreszenzintensitäten einhergehen. In Kombination mit dem oben beschriebenen Ergebnis der beiden analytischen Untersuchungen, dass der Grad der Europiumdotierungen in den Eu-VSOPs keinen Einfluss auf das Aufnahmeverhalten durch die Zellen hat, kann geschlossen werden, dass

die am Fluoreszenzmikroskop beobachteten verschieden starke Fluoreszenzintensitäten nur durch die unterschiedlichen Europiumanteile verursacht werden konnten und nicht etwa durch variierende Mengen an aufgenommenen Eu-VSOPs.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die fluoreszenzmikroskopische Bildgebung der von den RAW-264.7 aufgenommenen Eu-VSOPs empfindlicher ist als die klassische Berliner Blau-Färbung. Folglich ist damit die Möglichkeit gegeben, hochsensitiv lokale Verteilungen von Eisenoxid-Nanopartikeln in Form von Partikelanreicherungen oder –aggregationen auf zellulärer Ebene histologisch zu untersuchen, was sowohl für Fragestellungen der Bioverteilung als auch der Pharmakokinetik von entscheidender Bedeutung ist. Zudem besitzt diese Form des optischen qualitativen Europiumnachweises den Vorteil, nicht von externem oder endogenem Eisen verfälscht zu werden. Dieser Vorteil ist ebenfalls für quantitative Analysen gegeben. Der Nachweis von parenteral verabreichten Eisenoxid-Nanopartikeln in Geweben in klinisch relevanten Dosen bei etwa 50  $\mu\text{mol Fe/kg}$  ist eine enorme Herausforderung, da im Vergleich zum verabreichten Nanopartikeleisen die Hintergrundkonzentration an körpereigenem Eisen, selbst nach sorgfältiger Exsanguination und anschließender Perfusion mit Kochsalzlösung extrem hoch sein kann (7). So besteht mit dem Phenanthrolinnachweis das Risiko, bei eventuellem Vorhandensein partikelfremden Eisens die Menge der Eisenoxid-Nanopartikel zu überschätzen. Hingegen ermöglicht die Nachweismethode über die Europiumfluoreszenz eine eindeutige, unverwechselbare Detektion ausschließlich der Eisenoxid-Nanopartikel. Darüber hinaus kann die Quantifizierung von Partikelkonzentrationen in biologischen Geweben mit einer Sensitivität sogar bis in den pikomolaren Bereich erfolgen, wenn dafür ein Nachweisverfahren wie etwa die zeitaufgelöste Fluoreszenz (TRF) eingesetzt wird (25). Dessen ungeachtet bietet die hier etablierte optische Methode der quantitativen Bestimmung Europium-dotierter Eisenoxid-Nanopartikel eine vielversprechende und vor allem kostengünstige Alternative zu herkömmlichen Analysetechniken, etwa der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS).

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Eu-VSOPs verwendet, welche zur elektrostatischen Stabilisierung eine Citratbeschichtung besaßen. Ob sich die hier vorgestellten fluoreszenzoptischen Nachweismethoden direkt auf andere Europium-dotierte SPIOs übertragen lassen, wie etwa Partikel mit sterischer Stabilisierung, wäre ein interessanter Forschungsansatz für die Zukunft.

## Literaturverzeichnis

1. Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol* 2003;13:1266-1276.
2. Wang Y-XJ, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 2001;11:2319-2331.
3. Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997;7:258-263.
4. Silva AKA, Wilhelm C, Kolosnjaj-Tabi J, Luciani N, Gazeau F. Cellular transfer of magnetic nanoparticles via cell microvesicles: impact on cell tracking by magnetic resonance imaging. *Pharmaceut Res* 2012;29:1392-1403.
5. Löwa N, Knappe P, Wiekhorst F, Eberbeck D, Thünemann AF, Trahms L. Hydrodynamic and magnetic fractionation of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging. *J Magn Mater* 2015;380:266-270.
6. Taupitz M, Schmitz S, Hamm B. Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development. *RoFo* 2003;175:752-765.
7. Wagner S, Schnorr J, Pilgrimm H, Hamm B, Taupitz M. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol* 2002;37:167-177.
8. Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Kravec I, Pilgrimm H, Bergmann-Fritsch H, Hamm B. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 2004;39:394-405.
9. Wagner M, Wagner S, Schnorr J, Schellenberger E, Kivelitz D, Krug L, Dewey M, Laule M, Hamm B, Taupitz M. Coronary MR angiography using citrate - coated very small superparamagnetic iron oxide particles as blood - pool contrast agent: Initial experience in humans. *J Magn Reson Imaging* 2011;34:816-823.
10. Schnorr J, Taupitz M, Schellenberger E, Warmuth C, Fahlenkamp U, Wagner S, Kaufels N, Wagner M. Cardiac magnetic resonance angiography using blood-pool contrast agents: comparison of citrate-coated very small superparamagnetic iron oxide particles with gadofosveset trisodium in pigs. *RoFo* 2011;184:105-112.

11. Ludwig A, Poller WC, Westphal K, Minkwitz S, Lättig-Tuennemann G, Metzkow S, Stangl K, Baumann G, Taupitz M, Wagner S. Rapid binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans. *Basic Res Cardiol* 2013;108:1-13.
12. Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Wagner S, Wuerfel JT, Infante-Duarte C. Iron oxide magnetic nanoparticles highlight early involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *ASN Neuro* 2013;5:89-98.
13. Tysiak E, Asbach P, Aktas O, Waiczies H, Smyth M, Schnorr J, Taupitz M, Wuerfel J. Beyond blood brain barrier breakdown—in vivo detection of occult neuroinflammatory foci by magnetic nanoparticles in high field MRI. *J Neuroinflammation* 2009;6:20.
14. Wagner S, Schnorr J, Ludwig A, Stangl V, Ebert M, Hamm B, Taupitz M. Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *Int J Nanomedicine* 2013;8:767-779.
15. Scharlach C, Kratz H, Wiekhorst F, Warmuth C, Schnorr J, Genter G, Ebert M, Mueller S, Schellenberger E. Synthesis of acid-stabilized iron oxide nanoparticles and comparison for targeting atherosclerotic plaques: Evaluation by MRI, quantitative MPS, and TEM alternative to ambiguous Prussian blue iron staining. *Nanomedicine: NBM* 2015;11:1085-1095.
16. Yuan X-M, Li W, Baird SK, Carlsson M, Melefors O. Secretion of ferritin by iron-laden macrophages and influence of lipoproteins. *Free Radic Res* 2004;38:1133-1142.
17. Lee F-Y, Lee T-S, Pan C-C, Huang A-L, Chau L-Y. Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1998;138:281-288.
18. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, Winterhalter S, Wagner S, Kresse M, Semmler W, Wolf K-J. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Invest Radiol* 2000;35:460-471.
19. Cohen S, Pellach M, Kam Y, Grinberg I, Corem-Salkmon E, Rubinstein A, Margel S. Synthesis and characterization of near IR fluorescent albumin nanoparticles for optical detection of colon cancer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013;33:923-931.
20. Groman EV, Bouchard JC, Reinhardt CP, Vaccaro DE. Ultrasmall mixed ferrite colloids as multidimensional magnetic resonance imaging, cell labeling, and cell sorting agents. *Bioconjug Chem* 2007;18:1763-1771.
21. Clark ML. Development of dual modality lanthanide-doped magnetite nanoparticles for potential biomedical imaging. ProQuest Dissertations Publishing, 2014.

22. Pauporte T, Pelle F, Viana B, Aschehoug P. Luminescence of nanostructured Eu<sup>3+</sup>/ZnO mixed films prepared by electrodeposition. *J Phys Chem C* 2007;111:15427-15432.
23. Sicchieri LB, de Andrade Natal R, Courrol LC. Fluorescent lifetime imaging microscopy using Europium complexes improves atherosclerotic plaques discrimination. *Int J Cardiovas Imag* 2016;32:1595-1604.
24. Scharlach C, Mueller L, Wagner S, Kobayashi Y, Kratz H, Ebert M, Jakubowski N, Schellenberger E. LA-ICP-MS allows quantitative microscopy of europium-doped iron oxide nanoparticles and is a possible alternative to ambiguous Prussian blue iron staining. *J Biomed Nanotechnol* 2016;12:1001-1010.
25. Kobayashi Y, Hauptmann R, Kratz H, Ebert M, Wagner S, Taupitz M. Europium doping of superparamagnetic iron oxide nanoparticles enables their detection by fluorescence microscopy and for quantitative analytics. *Technol Health Care* 2017;25:457-470.
26. Ariza de Schellenberger A, Hauptmann R, Millward JM, Schellenberger E, Kobayashi Y, Taupitz M, Infante-Duarte C, Schnorr J, Wagner S. Synthesis of europium-doped VSOP, customized enhancer solution and improved microscopy fluorescence methodology for unambiguous histological detection. *J Nanobiotechnology* 2017;15:71.
27. Goodarzi A, Sahoo Y, Swihart M, Prasad P. Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles. *Mat Res Soc Symp Proc* 2011;789:N6.6.1-6.6.6.
28. De Silva CR, Smith S, Shim I, Pyun J, Gutu T, Jiao J, Zheng Z. Lanthanide (III)-doped magnetite nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2009;131:6336-6337.
29. Ariza de Schellenberger A, Kratz H, Farr TD, Loewa N, Hauptmann R, Wagner S, Taupitz M, Schnorr J, Schellenberger EA. Labeling of mesenchymal stem cells for MRI with single-cell sensitivity. *Int J Nanomed* 2016;11:1517.
30. Hemmilae I, Dakubu S, Mikkala V-M, Siitari H, Loevgren T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal Biochem* 1984;137:335-343.
31. Hemmilae I, Mikkala V-M. Time-resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assays. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001;38:441-519.
32. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, USA: Springer Science and Business Media, 2006:679.
33. Huang J, Bu L, Xie J, Chen K, Cheng Z, Li X, Chen X. Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles. *ACS Nano* 2010;4:7151-7160.

# Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Yuske Kobayashi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Entwicklung einer bimodalen Sonde für die MRT- und Fluoreszenzbildgebung auf Basis Europium-dotierter Eisenoxid-Nanopartikel“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

# Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Yuske Kobayashi hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Scharlach C, Müller L, Wagner S, Kobayashi Y, Kratz H, Ebert M, Jakubowski N, Schellenberger E. LA-ICP-MS Allows Quantitative Microscopy of Europium-Doped Iron Oxide Nanoparticles and is a Possible Alternative to Ambiguous Prussian Blue Iron Staining. J Biomed Nanotechnol. 2016; 12(5): 1001-10.

Vorbereitend hat Herr Kobayashi zunächst geeignete Enhancersysteme für die Verstärkung der Europiumfluoreszenz mithilfe von Literaturrecherche sowie die darauf basierenden Verifikationsversuche evaluiert, wobei er die Verifikationsversuche selbst ebenfalls durchführte. Danach hat er in Absprache mit den Koautoren ein analytisch-optisches Verfahren zur Qualitätskontrolle der synthetisierten Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikel konzipiert, um die Anteile der Europiumionen im Verhältnis zu den Eisenionen nach der Synthese exakt zu bestimmen.

Der Fertigstellung dieses Konzepts ließ Herr Kobayashi die Durchführung der Qualitätskontrolle und die Auswertung der Resultate an den Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikeln, entsprechend des Konzepts folgen. Ebenso wertete er Transmissionselektronenmikroskopie- (TEM-) Aufnahmen der Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikel aus, um aus der mittleren Größe der Nanopartikel die mittlere Anzahl der Eisenionen pro Nanopartikel zu bestimmen.

Schließlich hat Herr Kobayashi für die Publikation die entsprechenden Manuskriptteile in Methoden, Resultate und Diskussion verfasst und an der Finalisierung des Manuskripts mitgearbeitet.



**Publikation 2:** Kobayashi Y, Hauptmann R, Kratz H, Ebert M, Wagner S, Taupitz M. Europium doping of superparamagnetic iron oxide nanoparticles enables their detection by fluorescence microscopy and for quantitative analytics. *Technol Health Care*. 2017; 25: 457-470.

Zunächst hat Herr Kobayashi an der Modifizierung und Weiterentwicklung der Enhancerlösung aus Publikation 1 im Hinblick auf analytische und histologische Anwendungen gearbeitet. Dies erfolgte über Literaturrecherche und entsprechende Verifikationsuntersuchungen.

Mit der weiterentwickelten Enhancerlösung hat Herr Kobayashi anhand des in Publikation 1 erarbeiteten Konzepts die synthetisierten Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikel hinsichtlich Verhältnis der Europium- zu den Eisenionen qualitätskontrolliert.

Es folgten Konzipierungen von Verfahren zu Fluoreszenzuntersuchungen mit der neuen Enhancerlösung am Zellmodell RAW264.7, die mit Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikeln inkubiert wurden. Aus den qualitativen Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie ergaben sich die Abbildungen Fig. 2 und 3. Aus den quantitativen, analytischen Untersuchungen mittels Spektrophotometrie ergaben sich die Abbildungen Fig. 4, 5 und Fig. 6.

Zusätzlich zu den fluoreszenzoptischen Untersuchungen hat Herr Kobayashi magnetresonanztomographische Aufnahmen eines Nanopartikelphantoms, in welchem eine Verdünnungsreihe von Eisenoxid-Nanopartikeln jeweils mit und ohne Europiumdotierung eingebracht war, ausgewertet, woraus Abbildung Fig. 1 entstand.

Neben den beschriebenen Arbeiten, welche den überwiegenden Anteil dieser Publikation ausmachen, hat Herr Kobayashi die Draft-Version des Manuskripts verfasst, mit den Koautoren die Überarbeitung kommuniziert und schließlich das Manuskript finalisiert.

**Publikation 3:** Ariza de Schellenberger A, Hauptmann R, Millward JM, Schellenberger E, Kobayashi Y, Taupitz M, Infante-Duarte C, Schnorr J, Wagner S. Synthesis of europium-doped VSOP, customized enhancer solution and improved microscopy fluorescence methodology for unambiguous histological detection. J Nanobiotechnol. 2017; 15(71): 1-14.

Die in der Publikation 2 vorgestellte neue Enhancerlösung wurde von Herrn Kobayashi hinsichtlich ihrer Eigenschaften weiter untersucht. Dazu erarbeitete er mit Herrn Dr. Hauptmann ein Konzept, mit welchem die neue Enhancerlösung mit der kommerziell erhältlichen Enhancerlösung verglichen werden konnte.

Zunächst hat Herr Kobayashi untersucht, inwieweit sich die beiden Enhancerlösungen in ihrem Vermögen hinsichtlich Fluoreszenzverstärkung der Europiumfluoreszenz voneinander unterscheiden. Daraus resultierte die Abbildung Fig. 2. Weiter hat er den Einfluss von Fremdionen auf die Fluoreszenzverstärkung der beiden Enhancerlösungen untersucht, woraus die Abbildung Fig. 3 entstand. Auch die Auswirkung der Änderung des pH-Werts wurde überprüft; aus dieser Untersuchung entstand die Abbildung Figure S2 im Additional file 4. Schließlich verglich Herr Kobayashi die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzverstärkung der Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikel durch die beiden Enhancerlösungen. Diese Untersuchung fand in Abbildung Fig. 4 ihren Abschluss.

Herr Kobayashi trug mit seiner Kommunikation mit den Koautoren zu Überarbeitungen am Manuskript bei und arbeitete an der Finalisierung des Manuskripts aktiv mit.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## Der Promotion zugrunde liegende Publikationen

Scharlach C, Müller L, Wagner S, Kobayashi Y, Kratz H, Ebert M, Jakubowski N, Schellenberger E. LA-ICP-MS Allows Quantitative Microscopy of Europium-Doped Iron Oxide Nanoparticles and is a Possible Alternative to Ambiguous Prussian Blue Iron Staining. J Biomed Nanotechnol. 2016; 12(5): 1001-10.

<https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2230>

Kobayashi Y, Hauptmann R, Kratz H, Ebert M, Wagner S, Taupitz M. Europium doping of superparamagnetic iron oxide nanoparticles enables their detection by fluorescence microscopy and for quantitative analytics. Technol Health Care. 2017; 25: 457-470.

<https://doi.org/10.3233/THC-161285>

Ariza de Schellenberger A, Hauptmann R, Millward JM, Schellenberger E, Kobayashi Y, Taupitz M, Infante-Duarte C, Schnorr J, Wagner S. Synthesis of europium-doped VSOP, customized enhancer solution and improved microscopy fluorescence methodology for unambiguous histological detection. J Nanobiotechnol. 2017; 15(71): 1-14.

<https://doi.org/10.1186/s12951-017-0301-6>

# **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

Scharlach C, Müller L, Wagner S, **Kobayashi Y**, Kratz H, Ebert M, Jakubowski N, Schellenberger E. LA-ICP-MS Allows Quantitative Microscopy of Europium-Doped Iron Oxide Nanoparticles and is a Possible Alternative to Ambiguous Prussian Blue Iron Staining. J Biomed Nanotechnol. 2016; 12(5): 1001-10.

DOI: 10.1166/jbn.2016.2230

**Kobayashi Y**, Hauptmann R, Kratz H, Ebert M, Wagner S, Taupitz M. Europium doping of superparamagnetic iron oxide nanoparticles enables their detection by fluorescence microscopy and for quantitative analytics. Technol Health Care. 2017; 25: 457-470.

DOI: 10.3233/THC-161285

Ariza de Schellenberger A, Hauptmann R, Millward JM, Schellenberger E, **Kobayashi Y**, Taupitz M, Infante-Duarte C, Schnorr J, Wagner S. Synthesis of europium-doped VSOP, customized enhancer solution and improved microscopy fluorescence methodology for unambiguous histological detection. J Nanobiotechnol. 2017; 15(71): 1-14.

DOI: 10.1186/s12951-017-0301-6

Millward JM, Ariza de Schellenberger A, Berndt D, Hanke-Vela L, Schellenberger E, Waiczies S, Taupitz M, **Kobayashi Y**, Wagner S, Infante-Duarte C. Application of Europium-Doped Very Small Iron Oxide Nanoparticles to Visualize Neuroinflammation with MRI and Fluorescence Microscopy. Neuroscience. 2017; Im Druck befindlich.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.014

Klene C, Jungen C, Okuda K, **Kobayashi Y**, Helberg A, Mester J, Meyer C, Nakajima K. Influence of ROI definition on the heart-to-mediastinum ratio in planar  $^{123}\text{I}$ -MIBG imaging. J Nucl Cardiol. 2016.

DOI: 10.1007/s12350-016-0708-8

Berliner C, Tienken M, Frenzel T, **Kobayashi Y**, Helberg A, Kirchner U, Klutmann S, Beyersdorff D, Budäus L, Wester H-J, Mester J, Bannas P. Detection rate of PET/CT in patients with biochemical relapse of prostate cancer using [ $^{68}\text{Ga}$ ]PSMA I&T and comparison with published data of [ $^{68}\text{Ga}$ ]PSMA HBED-CC. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017; 44:670-677.

DOI: 10.1007/s00259-016-3572-5

Pohland M, **Kobayashi Y**, Glumm J. Fluorescence detection of Europium-doped very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in murine hippocampal slice cultures. Neural Regen Res. 2018; 13(4):637-638.

DOI: 10.4103/1673-5374.230284

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. M. Taupitz danke ich, dass er mir als Doktorvater im Rahmen des DFG-Projekts „Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel für die Zelluläre und Molekulare MR-Bildgebung (KFO 213)“ die Möglichkeit gab, diese im hohen Maße interdisziplinäre Arbeit realisieren zu können. Ebenfalls für die stete Gesprächsbereitschaft und Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Herrn Dr. H. Kratz, Herrn Dr. R. Hauptmann, Frau Dr. S. Wagner, Frau Dr. A. Ariza de Schellenberger und Frau M. Ebert danke ich für ihre Hilfe sowohl in theoretischen wie auch in praktischen Belangen. Bei ihnen erlernte ich insbesondere das effektive Arbeiten in einem interdisziplinären Team. Frau Dr. I. Gemeinhardt möchte ich für ihre zahlreichen Diskussionen und Ratschläge danken. Ferner danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen der AG Experimentelle Radiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft.

Aber mein größter Dank geht an die Pflegekräfte des Hospitals zum Heiligen Geist in Hamburg, die sich mit Hingabe und Engagement meiner Mutter annahmen und mir damit ermöglichten, mit ruhigem Gewissen in Berlin arbeiten zu können. Ohne sie wäre überhaupt ein Beginn dieser Arbeit unmöglich gewesen. Ihren unermüdlichen Einsatz trotz enormer Anstrengung bei der Pflegearbeit zu sehen gab mir mehr als einmal die nötige moralische Unterstützung, diese Promotion zu einem Abschluss zu bringen.